

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО
ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 10 октября 2019 г. № 23 о присуждении
Самохвалову Алексею Владимировичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата химических наук

Диссертация «Изучение взаимодействия аптамеров с охратоксином А: количественные закономерности и аналитическое применение», по специальности 03.01.04 Биохимия, принята к защите 02.04.2019 г., протокол № 10, диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказами Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк, от 30 сентября 2015 года № 1166/нк и от 13 марта 2019 года № 222/нк.

Соискатель

Самохвалов Алексей Владимирович (1992 года рождения) в 2014 г. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева», кафедру биотехнологии и промышленной экологии по специальности 19.03.01 «Биотехнология». С 2014

г. по 2018 г. обучался в аспирантуре Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (в 2015 г. реорганизован в Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)) в рамках учебной очной программы 03.01.04 «Биохимия». В 2018 г. на базе ФИЦ Биотехнологии РАН Самохвалов А.В. защитил научно-исследовательскую работу «Изучение взаимодействия аптамеров с ократоксином А: количественные закономерности и аналитическое применение» с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» и по настоящее время работает в ФИЦ Биотехнологии РАН на должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель

Жердев Анатолий Виталиевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Официальные оппоненты

Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Институт химии, профессор кафедры общей и неорганической химии.

Спиридонова Вера Алексеевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, старший научный сотрудник отдела хроматографического анализа.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен тем, что:

доктор химических наук Горячева Ирина Юрьевна является высококвалифицированным специалистом в области биоаналитических

систем и оптических методов регистрации образования межмолекулярных комплексов.

доктор биологических наук Спиридонова Вера Алексеевна является высококвалифицированным специалистом в области изучения свойств аптамеров и закономерностей их взаимодействия с лигандами.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в ведущих рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Самохвалова Алексея Владимировича.

Ведущая организация

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Составитель отзыва – заведующий кафедрой аналитической химии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», профессор, доктор химических наук Евтюгин Геннадий Артурович.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что Казанский (Приволжский) федеральный университет является признанным отечественным центром фундаментальных и прикладных исследований в области биоаналитических и биосенсорных систем, что в полной мере соответствует тематике диссертационной работы Самохвалова А.В.

Высокая квалификация официальных оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы Самохвалова Алексея Владимировича.

Публикации

Основные результаты диссертационной работы Самохвалова А.В. изложены в трех статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в рекомендованный ВАК РФ «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций», что соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции

Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168).

Список статей:

1. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination. *Analytica Chimica Acta*, 2017, v. 962, p. 80–87.
2. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Measurement of (aptamer – small target) KD using the competition between fluorescently labeled and unlabeled target and the detection of fluorescence anisotropy. *Analytical Chemistry*, 2018, v. 90, N 15, p. 9189–9198.
3. **Samokhvalov A.V.**, Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The registration of aptamer–ligand (ochratoxin A) interactions based on ligand fluorescence changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, v. 505, N 2, p. 536–541.

Результаты работы также опубликованы в материалах семи научных конференций.

1. **Самохвалов А.В.**, Сафенкова И.В., Берлина А.Н., Жердев А.В., Гаур М.С., Дзантиев Б.Б. Применение аптамеров для детекции низкомолекулярных токсичных контаминант окружающей среды и пищевой продукции. Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Биотехнология в комплексном развитии регионов». 15-17 марта 2016 г., Москва, с. 95-96.
2. Safenkova I.V., **Samokhvalov A.V.**, Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Strategy of enhanced fluorescence polarization based on aptamer – protein anchor complexes for sensitive and rapid detection of ochratoxin A. *Book of Abstracts of the 8th Bordeaux RNA Club Meeting Symposium*, June 24-25, 2016, Bordeaux, France. Th. P67.
3. **Самохвалов А.В.**, Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка аптамерного поляризационного флуоресцентного анализа для определения охратоксина А. Сборник материалов XXIX зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-10 февраля 2017 г. М.:

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, с. 145.

4. **Самохвалов А.В.** Аптамерный поляризационный флуоресцентный анализ с усилением сигнала для определения охратоксина А. Материалы IX Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 20-22 февраля 2017 г., Москва, т. 2, с. 528-529.

5. **Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.** Using anchor constructions to increase sensitivity of fluorescent polarisation aptamer assay: A case study for ochratoxin A. Biocatalysis–2017: Abstracts of 11th International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”. June 25-30, 2017, Moscow region, Russian Federation. P. 194-195.

6. **Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.** Using aptamer-gold nanoparticles conjugates for rapid ochratoxin A detection by fluorescent polarization. Book of Abstracts of the Aptamers in Bordeaux 2017 Conference, September 22-23, 2017, Bordeaux, France. P. 50.

7. **Самохвалов А.В., Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.** Экспрессная детекция охратоксина А, основанная на использовании аптамеров в качестве рецепторных молекул и регистрации поляризации флуоресценции. Тезисы Юбилейной конференции по микологии и микробиологии. Москва, 11-12 апреля 2018 г. В журн.: Успехи медицинской микологии, 2018, т. 19, с. 326-328.

На диссертацию и автореферат поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента Горячевой Ирины Юрьевны, доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Институт химии, профессор кафедры общей и неорганической химии. Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. При оценке различных эффектов автор не всегда указывает количество параллельных экспериментов и доверительные интервалы.

Например, «интенсивность максимума флуоресценции возрастает на 28%»; «для 30 нМ ОТА уменьшение составляет 45%, а для 10 нМ – 50%».

2. К сожалению, в работе не представлен спектр возбуждения полосы флуоресценции ОТА. Автор не совсем удачно называет испускание при коротковолновом возбуждении ОТА (262 нм) дополнительным максимумом флуоресценции. Также автором не высказано предположений о причинах и природе увеличения интенсивности эмиссии при коротковолновом возбуждении.

3. Теоретические данные рис. 35 указывают на то, что использование стрептавидина в качестве якоря позволяет достичь практически максимально возможного значения поляризации флуоресценции. Экспериментальные же данные указывают на весьма существенное увеличение поляризации при переходе от двойного комплекса аптамер-стрептавидин к тройному, с участием IgG. С чем автор связывает полученное расхождение?

4. В Заключение работы автор указывает, что «Проведена апробация разработанной поляризационной флуоресцентной аптамерной системы для детекции охратоксина А в пробах вина», однако в работе речь идет о пробах только белого вина. Для методов, основанных на оптическом способе детектирования аналитического сигнала, цвет и другие характеристики пробы могут иметь решающее значение и определять возможность/невозможность проведения анализа.

5. Данные, представленные на рис. 44, вряд ли позволяют заключить, что распределение наночастиц золота по размеру «узкое».

6. Авторы не полностью приводят расчет теоретического количества молекул стрептавидина на одну наночастицу золота. Полученное значение 7 слишком мало, предположительно указывает на арифметическую ошибку.

Отзыв официального оппонента Спиридоновой Веры Алексеевны, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.

Белозерского, старший научный сотрудник отдела хроматографического анализа. Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. Вопрос, можно ли было ввести метку по 3'-концу аптамера и могло ли это усилить эффективность связывания, остался открытым.

2. В работе присутствуют некоторые недочеты, так концентрации реагентов на графике 23 не были отражены в методической части. На графике 35 не указаны конкретные значения молекулярных масс, по которым строили зависимости поляризации флуоресценции от масс комплекса. В методическом разделе не приведены измерения концентраций, используемых аптамеров в оптических единицах при 260 нм, подтверждающих реальные концентрации вещества в пробирке.

Отзыв ведущей организации Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. При обсуждении структуры аптамера, специфичного к ОТА, и аналитических характеристик определения ОТА с его помощью необходимо было привести сравнение предела обнаружения и интервала определяемых концентраций с параметрами других вариантов определения указанного соединения, включая данные иммуноанализа и биосенсоры на основе аптамеров (аптасенсоры). Это позволило бы оценить вклад предлагаемых методических решений в достижение высокой чувствительности определения аналитов.

2. Хотя в начале работы упоминаются 4 структуры аптамера, все последующие эксперименты были проведены только с одним аптамером. Было бы полезно сравнить достигнутые результаты определения ОТА с другими потенциальными кандидатами (пусть не оптимальными) хотя бы для того, чтобы понять, насколько важны структурные факторы (строение аптамера) по сравнению с оптимизацией условий измерения сигнала.

3. При обсуждении собственной флуоресценции ОТА как сигнала, отражающего его связывание с аптамером, автором допускается дублирование информации в графиках и уравнениях линейных регрессий, что

представляется явно избыточным (стр.95). Также текстуально дублируются фразы о соответствии предела обнаружения ОТА и норм его содержания в продуктах питания в разделах, посвященных использованию белковых «якорей» и наночастиц золота.

4. Достигнутый предел обнаружения сопоставим с нормируемыми концентрациями ОТА (1.45 мкг/кг и 0.5-10 мкг/кг, стр.106). Автор называет достигнутое значение предела обнаружения аналитически значимым. Оставляя за скобками неудачный термин, отметим, что для практического использования тест должен давать возможность измерения концентраций аналита, не менее чем в 3 раза меньших, чем его нормируемое содержание в объекте контроля.

5. Подписи к рисункам, содержащим градуировочные зависимости с интервалами ошибок, должны содержать указание на число параллельных измерений. Также необходимо указать, как оценивалась повторяемость результата (какие потенциальные источники ошибок варьировали).

6. Работа бы выиграла, если бы автор в Заключение кратко изложил свое видение перспектив дальнейшего развития предложенных подходов.

На автореферат поступило **шесть отзывов**.

Ермолаева Татьяна Николаевна, доктор химических наук, профессор, **Фарафонова Ольга Вячеславовна**, кандидат химических наук, доцент кафедры химии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Липецкий государственный технический университет». Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. Неясно, как определялись пределы обнаружения охратоксина А (стр.15), это относительная характеристика?

2. На стр 17 вероятно описка – «Предложенный принцип повышения предела обнаружения реализован с использованием белков.» Вероятно, снижения предела обнаружения.

Иванов Юрий Дмитриевич, заведующий лабораторией нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени

В.Н. Ореховича», доктор биологических наук, профессор. Отзыв положительный, замечаний нет.

Решетилов Анатолий Николаевич, заведующий лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук», доктор химических наук, профессор. Отзыв положительный, замечаний нет.

Сахаров Иван Юрьевич, доктор химических наук, профессор, кафедра химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный. Отзыв содержит следующие замечания:

1. На рис. 3 указаны только крайние значения концентраций ОТА (0.4 и 13.6 нМ), но не указаны значения промежуточных концентраций.
2. На рис. 15 и 16 невозможно понять, какая кривая соответствует какому образцу ОТА.
3. Остается также непонятным, каким образом автором были выбраны исследуемые олигонуклеотиды и как они соотносятся с аптамерами, описанными в литературе?

Хлебцов Николай Григорьевич, заведующий лабораторией нанобиотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, доктор физико-математических наук, профессор. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

Осипов Александр Павлович, кандидат химических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», кафедра функциональных наносистем и высокотемпературных материалов,

институт новых материалов и технологий. Отзыв положительный, не содержит замечаний.

В дискуссии приняли участие:

Доктор биологических наук Красновский Александр Александрович, доктор химических наук Еремин Сергей Александрович, доктор химических наук Савицкий Александр Павлович, кандидат биологических наук Жердев Анатолий Витальевич, доктор химических наук Дзантиев Борис Борисович, доктор биологических наук Крицкий Михаил Сергеевич.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Установлено, что G-квадруплексная структура аптамера, обеспечивающая связывание с охратоксином А, образуется только в присутствии ионов двухвалентных металлов.
- Разработан и успешно апробирован алгоритм определения равновесной константы взаимодействия аптамер-лиганд, основанный на регистрации анизотропии флуоресценции.
- Выявлено увеличение собственной флуоресценции охратоксина А в комплексе с аптамером и предложен его механизм.
- Разработан подход для снижения предела обнаружения поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа, основанный на включении аптамеров в комплексы с носителями — белками или наночастицами.

Теоретическая значимость исследования

- Показаны возможности регистрации анизотропии флуоресценции для количественной характеристики комплексообразования применительно к аптамер-лигандным взаимодействиям.
- С использованием матриц экстинкции-эмиссии показано, что комплексообразование с аптамером приводит к увеличению флуоресценции охратоксина А.
- На основании характеристики зависимости анизотропии флуоресценции от молекулярной массы предсказан и подтвержден эффект ее

модуляции при включении аптамеров в комплексы с высокомолекулярными носителями.

Практическая значимость исследования

- Предложен поляризационный флуоресцентный аптамерный анализ охратоксина А с усилением.
- Разработан метод пробоподготовки белого вина для проведения флуоресцентного аптамерного анализа.
- Проведена апробация предложенного метода и показано, что он позволяет определять охратоксин А в вине в концентрациях ниже предельно допустимой.
- Подготовлены рекомендации по созданию поляризационного флуоресцентного аптамерного анализа с использованием молекулярных якорей, которые имеют универсальный характер и могут применяться при детекции разных аналитов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

Для решения задач исследования использовались адекватные современные методы. Проведенные эксперименты включали необходимые повторности и контроли. Полученные результаты количественно обработаны; корректность сформулированных заключений и выводов статистически подтверждена.

Таким образом, представленные в диссертации А.В. Самохвалова результаты являются достоверными.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо автором диссертации, либо при его непосредственном участии, включавшим планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение

Диссертация Самохвалова Алексея Владимировича является законченной научно-квалификационной работой. Работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии.

На заседании 10 октября 2019 года Диссертационный совет принял решение присудить Самохвалову Алексею Владимировичу ученую степень кандидата химических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, участвовавших в заседании, из них 10 докторов биологических наук, 7 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, из 26 человек, входящих в состав Совета Д 002.247.01, проголосовал:

«За» присуждение ученой степени – 18

«Против» присуждения ученой степени – нет

Недействительных бюллетеней – нет

Заместитель председателя диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН,

доктор биологических наук, профессор  М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН,

кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

10 октября 2019 г.